

歯科と消化器疾患の関わり——これからの課題

日本歯科大学新潟生命歯学部内科学 大越 章吾

(昭和 58 年卒)

私はずっと長い間新潟大学第三内科及び昭和大学横浜市北部病院で肝臓病学特に HBV や HCV の肝炎ウイルスに関する研究を行ってきた。2014 年にここ日本歯科大新潟生命歯学部内科学講座に赴任して以来、“歯科大の内科”という環境でどのような研究をしたらよいのか？ということを考え模索してきました。

何故かといえばここは一般病院ですが、大学の附属機関であり、研究、教育機関という面を兼ね備えており、常にリサーチマインドを持ち続けていなければいけない場所だからです。そこが、私の感じた魅力でもあったわけです。

ここ内科は日本歯科大の大学院の機関に属しており、“全身関連学講座”という正式名称が付されているように、歯科と全身疾患という観点から歯科大の大学院生を向かい入れ、しかるべき研究テーマを与え、学位を取得させ教育するという責務を負っています。

また毎年、新潟大学と同じように科研費を申請することが教室員に義務づけられています。前任の柴崎先生は、極めて柔軟な発想から数十人もの学位の面倒を見てきましたが、実際、私がここで何をできるかということに関してはかなり頭を悩ませました。

その頃、中原学長から日本歯科大東京校の八重垣教授、石川教授という、歯髄の間葉系幹細胞を様々な細胞に分化させる研究を行っている先生をご紹介いただき、両先生が肝細胞に分化させ、肝硬変の再生医療の仕事をしていることを知りました。“歯科と接点を有し私のキャリアーの肝臓病学の研究を継続できる分野”という考えから、石川先生のご協力をいただき、翌年迎えた歯科大学院生と共に、実験を開始したところです。

一方本学には、歯科の河野教授を長とした睡眠歯科センターがあり、睡眠時無呼吸症 (OSAS) の患者が多く内科を併診しています。これに関しても何かできそうだという観点から、教室の長谷川、廣野、渡辺と相談し考えいくつかの臨床研究を行っています。廣野は OSAS と NASH という観点から本年科研費を獲得し臨床研究を開始しています。渡辺は OSAS と GERD の観点から本年の DDW で発表しました。

残念ながらいまだデータはなく、研究の端緒しかご紹介できませんが、今後の展望ということで、本稿では①歯髄細胞の肝細胞への分化と臨床応用(大越)②睡眠時無呼吸症と NASH (廣野)という 2 つのテーマに関してご紹介させていただきます。データが蓄積され、この頁が上書きされることを祈って簡単な紹介に代えさせていただきます。

① ヒト歯髄幹細胞から誘導分化させた肝細胞の解析とその臨床応用への道

歯髄由来の間葉系幹細胞

間葉系幹細胞(Mesenchymal Stem Cell)は古く骨髄の中に存在する幹細胞のうち、培養皿に付着して増殖し多分化能を有する細胞として同定された。間葉系幹細胞は骨、軟骨、脂肪細胞に分化することが以前から知られていた。近年 iPS 細胞による再生医療が(網膜の再生)が大いなる注目を集めているおり、本格的な臨床研究の段階に入りつつある。

Taniguchi らは iPS 細胞から誘導した肝細胞を用いて、間葉系細胞と内皮細胞とともに 3 次元で Liver Buds を形成させた人工肝臓を報告している(Nature)。しかしながら、iPS 細胞は遺伝子を導入するため、自分の細胞由来だが自分の細胞とは言えない自然界には存在しない細胞であるため、移植後の腫瘍形成や免疫の問題が存在する。一方最近 iPS 化するために導入する遺伝子が既存の遺伝子に変化を与えることが報告された。従ってこのような細胞を再生医療に用いることには、安全性の面で若干の不安も存在する。

一方 MSC など自己由来の Stem Cell は遺伝子導入をしないため発ガンなどのリスクは少ないと考えられる。またこれらは自分自身の細胞なので、感染や免疫の問題も少ない。

歯髄に MSC が存在することは、最初 Gronthos 2000 によって報告された。彼らは成人の歯から得られた歯髄由来の細胞は増殖力が高く、象牙質や骨組織を作ることがわかった。これは歯髄細胞が他の系統の細胞に分化するという事実他に他ならなかった。その後同じくこの細胞が脂肪細胞や神経細胞に分化することが示された。

最初に得られた歯髄由来の MSC(Dental Pulp Stem Cell:DPSC)は大人の永久歯由来であったが、その後脱落歯(Stem cells from human Exfoliated Deciduous teeth:SHED)や未成熟な永久歯の根尖乳頭由来のもの(Stem cells from apical papilla of human immature permanent teeth:SCAPs)などが資源として用いられている。特に SHED は他の DPSC に比して高い増殖能、他系統細胞への分化能を有し、また臍帯血と同様、廃棄されるものを有効な再生医療の資源として再利用するという面で、倫理的なハードルも低いいため Cell Banking として受け入れやすい。日本歯科大東京校では再生医療学講座の石川 博教授らが中心となって 2015 年、厚労省から認可を受けた歯髄バンクがスタートしている。

歯髄間葉系幹細胞の肝細胞への分化

2010 年に日本歯科大東京校の八重垣、石川らのグループは DPSC が肝細胞様細胞に分化することを始めて報告した。彼らは脱落歯から得られた細胞を HGF、Dexamethason、Oncostratin などの存在下に培養し肝細胞の形態やアルブミン、IGF-1 の産生を確認した。また培養液中の Urea が上昇するため、肝細胞に存在する Urea Cycle が機能している可能性

が示唆された。彼らは特に SHED が高い増殖能を有し、更に Hepatocyte Like Cell に効率よく分化することを示した。70 代の継台後も細胞は同様の Stem Cell Marker を示したため、この方法が再生医療に十分な細胞を供給できる可能性が示された。更に彼らは、肝不全ラットの脾臓に肝細胞に分化させた歯髄細胞を移植し、実際にこれらの細胞が肝に正着し、肝機能を改善しラットの生存率を伸ばすことを報告した。

近年、間葉系幹細胞から分泌されるエクソソーム (Exosome) が、急性肝障害の軽減や慢性肝障害における肝線維化の軽減に働くことが明らかになり、間葉系細胞の組織修復作用の機序として注目されている。今後はこれらの細胞外小胞 (Extracellular vesicles) が肝臓治療の重要なソースになっていくと考えられる。また間葉系細胞の細胞培養の上澄みには免疫抑制因子が存在することが注目されており、近年 GVHD の治療薬として認可された。MSC の有する組織修復作用、抗炎症作用、免疫抑制作用は今後一層注目されていくと予想される。

歯髄細胞バンク (日本歯科大学)

日本歯科大学では 2015 年より歯髄細胞バンクがスタートしている

Primary Teeth の脱落歯 (SHED) は永久歯に比べ、優れた Stem Cell の Potential を有する。これらの歯は通常は破棄されてしまうものであり、これらを保管し、将来個人が何らかの疾患に罹患した場合に Autologous な Stem Cell として治療に応用することは、倫理的なハードルも低く、骨髄細胞のように摂取に痛みを伴うこともないため、理想的な再生医療のための細胞バンクであると考えられる。以下に脱落歯バンクの利点をまとめると

- Auto の細胞であるため免疫学的な拒絶反応が少ない
- 病気になるはるか以前の細胞を Bank できる
- 痛みなく得られる
- 臍帯血に比してはるかにコストが少ない
- ES 細胞のような倫理的問題がない
- 臍帯血は造血幹細胞を得るのに適しているが、SHED は結合組織、歯、骨、神経、肝、脾など多様な細胞を得ることができる
- 増殖力が高いので十分な細胞量を得ることが可能である
- 硬い歯のエナメル質の中にある細胞であるため、外部からの被爆にさらされ難く、癌化のリスクが少ない可能性がある。

などがあげられる。

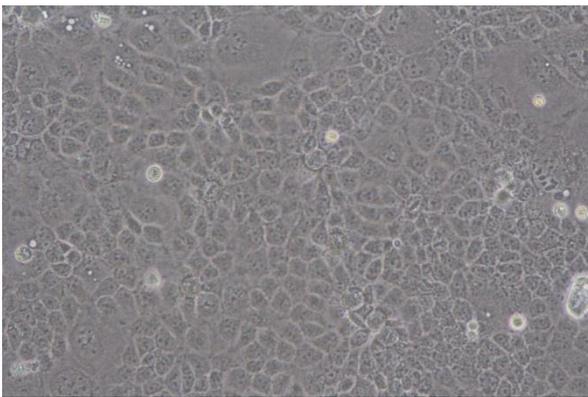
石川らは本再生医療に関して、骨髄細胞バンクの運用においては国の“再生医療等の安全性の確保等に関する法律”に基づき厚労省の認可を得て行っている (特定細胞加工物製造許可証: FA3160003)。同様に本学は厚生労働大臣から認定を受けた特定認定再生医療等委員会 (NA8150007) を有している。

当内科学教室における研究の現状と今後

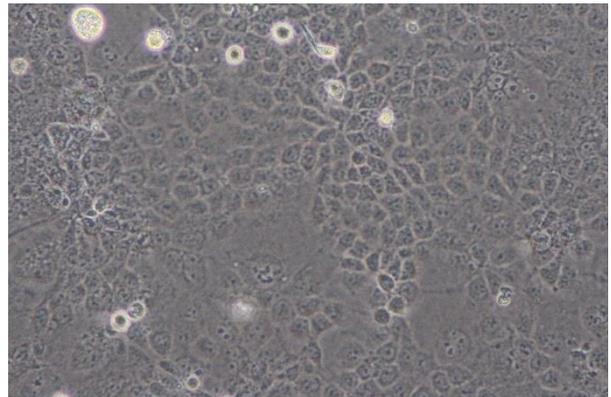
筆者(大越)が肝臓内科医であることより、縁あって2014年より東京校の石川教授と事あるごとに Discussion の機会を得ることができた。

今現在歯科麻酔学講座より大学院生の派遣を受けており、“歯科と肝(消化器)をつなぐ研究”という観点から石川らと以下の研究を開始している

これまでの予備的成果



Donor 1



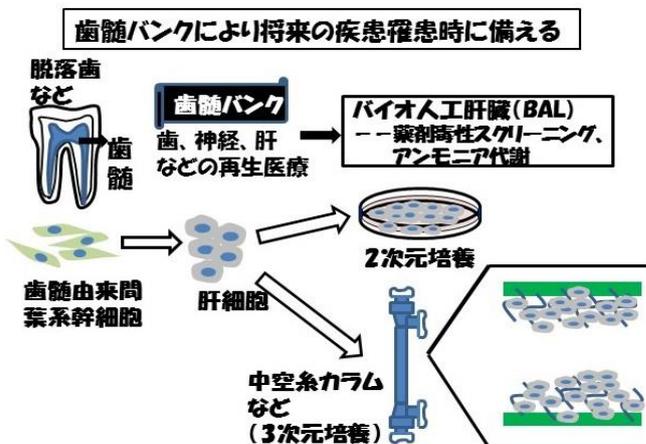
Donor 2

上に、脱落歯の歯髄から分化誘導させた肝細胞類似細胞を示す

石川らはこれまでこの歯髄 MSC 由来の肝細胞が尿素サイクルや凝固蛋白産生能などを有するかについて予備的な実験を行ってきた。歯髄 MSC から分化誘導した肝細胞をバイオカラム内で3次元培養し、上記の機能をアッセイした。結果、これらの細胞は、有意にフィブリノーゲン産生能を有し、高いアルブミンや ALT、ヘパラスチンの産生能を有していた。

今後の研究計画

今後の医療における培養肝細胞の役割を追求する: バイオ人工肝臓 (Bioartificial Liver :BAL)
にこの歯髄由来培養肝細胞が使えるか?



以前より、肝細胞株を3次元培養したバイオ人工肝臓 (BAL) が探求され、予後の不良な劇症肝炎の脳症改善と肝移植までの橋渡し治療として臨床試験が行われてきたが 成果は十分ではない。これは、高度な肝機能と増殖能を持ちかつ安全性の高い細胞資源が存在しないことが原因である。

一方肝臓は薬物代謝の中心臓器である。従って、BAL に使用される培養

肝細胞の有効な活用法は、薬物の毒性スクリーニングである。分子標的薬など今後次々に新薬が出現してくるが、これらの毒性や副作用の有無を事前に予測することは極めて重要である。薬剤の代謝能は個人によって異なるため、新薬の肝毒性を Screening するためには、再生された個人由来の肝細胞が必要となり、それが達成されれば、事前に副作用の出現を予測するテーラーメイド医療が可能となる。

具体的な研究計画

—これらの細胞はどれくらいのアンモニアの尿素変換能を有するのだろうか。



石川らのバイオ人工肝臓(BAL: バイオカラム)を左に示す。肝細胞の最も古典的な機能解析は、アンモニアの代謝能、主に尿素への転換能の検討である。①具体的には歯髄由来の間葉系幹細胞を既報の方法に従い肝細胞に分化させた後、左の装置内の中空系膜カラム(矢印)に生着させる。このカラムに5.0mM塩化アンモニウムを含む無血清培養液を約24~72時間持続ポンプを用いて還流させ流出液中

の尿素をColorimetryで測定しアンモニアの尿素への変換能を検証する更に、この細胞が高度な代謝能を有するか否かについて ②乳酸代謝能、③グルコース消費能について検討する。対照コントロールとしては肝細胞に分化する前の間葉系幹細胞や分化型肝がん細胞株、肝に無関係の細胞株(Hela細胞)など入手可能な限り多数の肝細胞株を検証し、この歯髄由来肝細胞の高次代謝機能を明確にする。

—これらの細胞はどれくらいの薬剤代謝能を有するのだろうか。

上記の代謝機能の解析機能の後、実際にどのような肝細胞特異的な因子が作動してこの歯髄間葉系幹細胞由来の幹細胞が成熟した肝細胞形質、特にBALのテーラーメイド医療への応用を視野に入れ、薬物代謝能について検証する。具体的にはPhase Iの薬剤代謝を司るcytochrome P450の1A2、2B6、3A4、3A7の遺伝子群の発現を定量的PCRで検討するとともに、尿素サイクルの酵素群や肝細胞特異的な転写因子であるHNF4 α や薬剤代謝を司る転写因子Pregnane X receptor (PXR)の発現の誘導を定量的PCR及び蛍光抗体による免疫染色によって解析する。

以上、幼少のときに得られる脱落歯をバンクとしてストックし、将来例えば肝細胞に分化させ、新規の強力な抗がん剤や免疫抑制剤が登場したときにその細胞を用いて事前に毒性を予測したり(テーラーメイド自家肝細胞)、また人工肝補助装置の資源として利用できるかという目的の基礎研究を開始したばかりです。

② 睡眠時無呼吸症候群における夜間間欠的低酸素血症の改善が肝線維化・脂肪化に及ぼす影響の解析

廣野 玄¹⁾、渡邊 和彦¹⁾、長谷川 勝彦¹⁾、河野 正己²⁾、大越 章吾¹⁾

1) 日本歯科大学新潟生命歯学部 内科学講座

2) 日本歯科大学新潟生命歯学部 睡眠歯科センター

(2016~2,018 夜間低酸素血症の改善による NASH 治療法の確立(16K09564) 基盤研究 C)

はじめに

本邦での睡眠時無呼吸症候群(SAS: sleep apnea syndrome)の患者数は現在約 300 万人と言われており、2003 年の山陽新幹線の居眠り事件以降、大きな社会的問題として注目をあびてきた。SAS は肥満もしくは顎が小さいことによる上気道の閉塞を原因とする閉塞性睡眠時無呼吸(OSA: obstructive sleep apnea)と中枢性睡眠時無呼吸(CSA: central sleep apnea)に分けられるが前者が圧倒的に多い。しかし、OSA の患者は肥満とは関係なく(肥満因子とは独立して)高血圧や糖尿病、脂質異常といったメタボリックシンドロームを合併しやすいことが知られている。その誘発因子として慢性的な夜間間欠的低酸素血症、および睡眠分断・覚醒が挙げられ、それらによって交感神経活動の亢進、血管への酸化ストレス、NF- κ B 経路を介する全身性炎症を引き起こし、インスリン抵抗性、高血圧、脳・心血管障害などを誘発することが考えられている。

OSA において最も有効性が高い治療手段は持続的陽圧呼吸療法(CPAP: continuous positive airway pressure)であり、1981 年に Sullivan ら¹⁾によって最初に報告され、日中の過度な眠気に関して消失または改善が認められている。さらに CPAP は OSA における心血管障害の発症率を有意に低下させ、近年のメタアナリシスでは有意な降圧効果も認められている。

一方、SAS はメタボリックシンドロームの起因になるだけでなく、非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD: nonalcoholic fatty liver disease)の発症にも強い関連性があることが報告されてきた²⁾。NAFLD は病理学的には細胞への脂肪沈着のみが主体の単純性脂肪肝(simple steatosis)または狭義の NAFLD と、肝細胞障害および炎症・線維化を伴う非アルコール性脂肪肝炎(NASH: nonalcoholic steatohepatitis)に大別されるが、特に NASH は肝硬変や肝癌へ進行する potential を持っている。近年、ウイルス関連肝硬変や肝癌が減少傾向にあり、代わりにメタボリックシンドロームの増加と共に NASH を原因とする肝癌が漸増傾向であり注目されている。正常肝から NASH への進展として Day ら³⁾の two hit theory が有名だが、Polotsky ら⁴⁾は肥満の OSA において組織学的に検討し、肥満による肝の脂肪化(first hit)に間欠的低酸素血症が加わること(second hit)によって NASH に進展するという仮説を立てている。しかし

現在、NASH への進展を阻止する有効な治療法は確立されておらず、いまだに手だてのない疾患である。さらに SAS に合併する NAFLD において、CPAP の導入による夜間間欠的低酸素血症の改善が肝障害の改善・NASH への進展予防に結びつくかどうかは現在十分な検討がされていない。以上のことをふまえ、我々は当院施設においてこれらを検討することを計画した。

本大学病院の特徴

日本歯科大学医科病院は日本睡眠学会認定医療機関であり、睡眠歯科センターを有し、月 700 名以上の CPAP で治療中の SAS 患者が受診している。我々内科医も積極的にその医療に携わっており、また、共同研究者の口腔外科医(河野)は日本睡眠学会の評議員であり、当分野において全国有数の診療経験を有している。

研究方法

<SAS患者におけるCPAP治療のALT/AST改善、肝線維化・脂肪化の改善に関する臨床パラメーターの割り出し>

CPAP 治療介入前に、個々の新規 SAS 患者の終夜睡眠ポリグラフ検査(PSG)データに加え、血液一般や HOMA-IR などのインスリン抵抗性などのデータを得る。さらに M2BPGi などの血清肝線維化マーカーや FibroScan502(インターメディカル)を用いて肝線維化のデータを得るとともに付属の脂肪化定量ソフト(CAP: controlled attenuation parameter)によって肝脂肪化レベルの客観的な数値を得る。CPAP 治療 1 年後を end point とし、治療開始前、6 か月後、1 年後において上記臨床データを蓄積し、最終的に SAS 患者における CPAP 治療の ALT/AST 値改善、肝線維化・脂肪化の改善効果を検証する。また多変量解析によって効果の得られた患者群の臨床的特徴を明らかにする。

<研究結果の仮定と今後の展望>

脂肪肝の原因の独立因子として、肥満、糖尿病、脂質異常症などが知られている。もし、1 年間の CPAP 治療を通して、SAS 患者の肥満度(BMI)、糖尿病の程度(HbA1c)、脂質異常の程度(LDL, TG)に変化がないにも関わらず、肝障害や肝線維化・脂肪化の改善が有意に認められれば、その SAS 患者に対する CPAP 治療による夜間低酸素血症の改善の有効性が考えられる。さらに、それら患者の臨床的背景の特徴を割り出し、積極的に CPAP 介入という薬物療法によらない NASH 治療の治療方針の実用化につながることを期待される。最終的には薬物療法によらない、肝疾患の新規治療法としての CPAP が秘めた可能性について、学会・論文の形で国内外の肝臓医に向けて情報を発信したい。